

CULTIVO *IN VITRO* DE *EUPHORBIA LACTIFLUA* PHIL. Y *EUPHORBIA COPIAPINA* PHIL. (EUPHORBIACEAE)

IN VITRO CULTURE OF *EUPHORBIA LACTIFLUA* PHIL. AND *EUPHORBIA COPIAPINA* PHIL. (EUPHORBIACEAE)

Mancinelli S. P.*, Gnecco D.S.**, Pooley T.A.**
Caamaño D.V.** y Beratto V.V.**

RESUMEN

La multiplicación "in vitro", la detección del tiempo de formación de látex y la aclimatación a las condiciones ambientales de nuestra zona, de *E. lactiflua* y *E. copiapina*, son los objetivos de este trabajo.

Explantes foliares de *E. lactiflua* y *E. copiapina*, recolectadas cerca de Caldera, III Región, formaron callos al cultivarlas en medio Murashige-Skoog con bencil-amino-purina, ácido naftalenacético y Giberelina (0.5, 1.5, 1.0 mg l⁻¹).

Plántulas de *E. lactiflua*, derivadas de callos tratados con los mismos reguladores en distinta concentración (1.5; 0.5 y 1.0 mg l⁻¹), formaron raíces al incubarlos con ácido indolbutírico, carbón activado y sacarosa (2 mg l⁻¹, 10 y 15 g l⁻¹). Callos de *E. copiapina* no diferencian yemas.

La importancia de este trabajo reside en la multiplicación clonal masiva de estas plantas, para utilizarlas como material básico para el estudio del control químico de las síntesis de isopreno junto a la identificación y valoración de otros compuestos presentes en el látex de estas especies. Esto constituye el objetivo central del Proyecto FONDECYT 91/0354.

PALABRAS CLAVES: Euphorbiaceae, *Euphorbia lactiflua*, *Euphorbia copiapina*, Cultivo de tejidos, Caldera, Chile.

INTRODUCCION

La biotecnología tiene actualmente un creciente campo de aplicaciones y el cultivo de teji-

* Departamento de Botánica, Facultad de Ciencias Naturales y Oceanográficas, Universidad de Concepción.

** Departamento de Química, Facultad de Química, Universidad de Concepción.

ABSTRACT

In vitro proliferation of *E. lactiflua* and *E. copiapina*, latex age time formation and hardiness improving to Concepción environmental condition are the goal of this paper.

Cultured leaf explants of *E. lactiflua* and *E. copiapina*, initiated callus on Murashige and Skoog medium supplemented with 0.5 mg l⁻¹ Benzylaminopurine, 1.5 mg l⁻¹ Naphtaleneacetic acid plus 1.0 mg l⁻¹ Gibberellic acid. *E. lactiflua* callus were quite organogenic treated with 1.5 mg l⁻¹ Benzylaminopurine, 0.5 mg l⁻¹ Naphtaleneacetic acid and 1.0 mg l⁻¹ Gibberellic acid. *E. lactiflua* plantlets rooted treated with 2 mg l⁻¹ indole-3 butiric acid, 10 g l⁻¹ Activated charcoal and 15 g l⁻¹ sucrose. Callus of *E. copiapina* were only proliferative. Plants were collected near Caldera, III Región, Chile. This work is a part of the Project Chemical Regulation of Isoprene Synthesis on Chilean Euphorbiaceae. (FONDECYT 91-0354).

KEYWORDS: Euphorbiaceae, *Euphorbia lactiflua*, *Euphorbia copiapina*, Tissue Culture, Caldera, Chile.

dos, en particular, provee una vía adecuada que permite multiplicar plantas en forma masiva, con las ventajas de permitir la selección de características valiosas. De esta manera, se puede reproducir especies vegetales por la calidad de su madera, por sus altos rendimientos agrícolas, resistencia a enfermedades, por sus metabolitos secundarios, o bien por ser especies apreciadas como ornamentales (Anderson, 1980; Murashige, 1978; Thorpe, 1978; Zenk, 1978).

Por otra parte, se puede eliminar varias dificultades que se presentan en la naturaleza:

dependencia de la estacionalidad, presencia de patógenos y otros (Hu & Wang, 1983).

E. lactiflua y *E. copiapina* son dos especies chilenas investigadas como fuente de terpenos (Bartulin *et al.*, 1982, 1984; Gnecco *et al.*, 1988). Las especies crecen en la III Región, que además de la gran distancia de Concepción, agregan el inconveniente de tener una temporada vegetativa dependiente de lluvias episódicas, permaneciendo sin hojas por largo tiempo. Se estima que la multiplicación por cultivo de tejidos puede aportar información relacionada con su ciclo de vida, inducción de terpenos (látex) en plantas intactas y/o callos (Yokoyama *et al.*, 1983), junto a su adaptación a condiciones climáticas diferentes al hábitat de la III Región.

MATERIALES Y METODOS

Plantas de *E. lactiflua* y *E. copiapina* se recolectaron en Junio de 1990, a 6.4 km al norte de Caldera, III Región*. Ejemplares de la primera se plantaron a la intemperie y numerosas raíces napiformes con yemas latentes de *E. copiapina*, se llevaron a invernadero y se colocaron en camas de arena para disponer de suficiente material de cultivo.

Explantos de *E. lactiflua*, provenientes de yemas apicales, laterales y de hojas, se desinfectaron superficialmente con hipoclorito de sodio al 5% por 10 minutos, se lavaron con agua estéril y luego permanecieron 1-2 minutos en $HgCl_2$ al 0.3%, enjuagándose varias veces con agua estéril. Explantos de *E. copiapina*, provenientes de hojas, se desinfectaron en igual forma.

Para inducir la formación de callo se utilizó medio Murashige-Skoog (1962), con micronutrientes según Simola y Santanen (1990), con Bencilaminopurina (BAP), ácido Naftalenacético (ANA), y Giberelina (GA3), a las concentraciones de 0.5; 1.5 y 1.0 mg l⁻¹, respectivamente (Harada, 1975). Para la diferenciación de yemas desde los callos, estos reguladores se agregaron a las concentraciones de 1.5; 0.5 y 1.0 mg l⁻¹.

Para inducir la diferenciación de raíces

desde las plántulas derivadas de las yemas, se agregó al medio de cultivo ácido Indolbutírico (IBA), Carbón Activado (CA) y Sacarosa, a las concentraciones de 2 m l⁻¹, 10 g l⁻¹ y 15 g l⁻¹ respectivamente.

Los medios se gelificaron con Bacto Agar al 0.7% y se esterilizaron en autoclave a 121°C y 104 KPa, durante 20 minutos.

Los explantes se colocaron en frascos de vidrio de 80 x 25 mm ø con 7 ml de medio, o en cajas Magenta de 70 x 70 x 70 mm. con una balsa o bandeja de polipropileno (Sigma, Membrane Raft). Se incubaron en una cámara de luces bajo una intensidad de 11.6 W m⁻², con régimen lumínico de 16:8 hrs. y a una temperatura de ±21 °C, y se cambiaron a medio fresco cada 30 días.

RESULTADOS Y DISCUSION

Los primeros ensayos se efectuaron con yemas apicales de *E. lactiflua*, las que no se activaron al incubarlas con BAP, ANA y GA3 (agosto, 1990). Cuando eclosionaron las hojas en ambas especies en septiembre, se continuaron las incubaciones sólo con estos órganos.

El comportamiento de las yemas de *E. lactiflua* podría atribuirse a imposición de latencia establecida bajo las condiciones imperantes en la III Región, la que se habría eliminado por el frío en Concepción. Aunque, también podría invocarse la acción de inhibidores inducidos por sequía prolongada en su lugar de origen (Wright, 1969). Marticorena (comunicación personal, 1992) señala que, en la misma temporada, plantas de esta especie que habitan en las quebradas que no registran lluvias carecen de hojas. Esta situación se revierte en las quebradas u otros lugares donde ha llovido. Considerando que en 1991 las hojas aparecieron en agosto, no podría invocarse la acción de stress hídrico debido al régimen pluviométrico de Concepción. Por lo tanto, la latencia tendría mayor relevancia; un tercer año de observaciones permitiría establecer si la permanencia de las hojas se debe a la carencia de agua o es una respuesta al fotoperíodo (Leopold & Kriedemann, 1975).

Los explantes foliares de *E. lactiflua*, bajo la acción de BAP, ANA y GA3 a las concentra-

* Se agradece la gentileza del Prof. H. L. Barrales, quien recolectó el material.

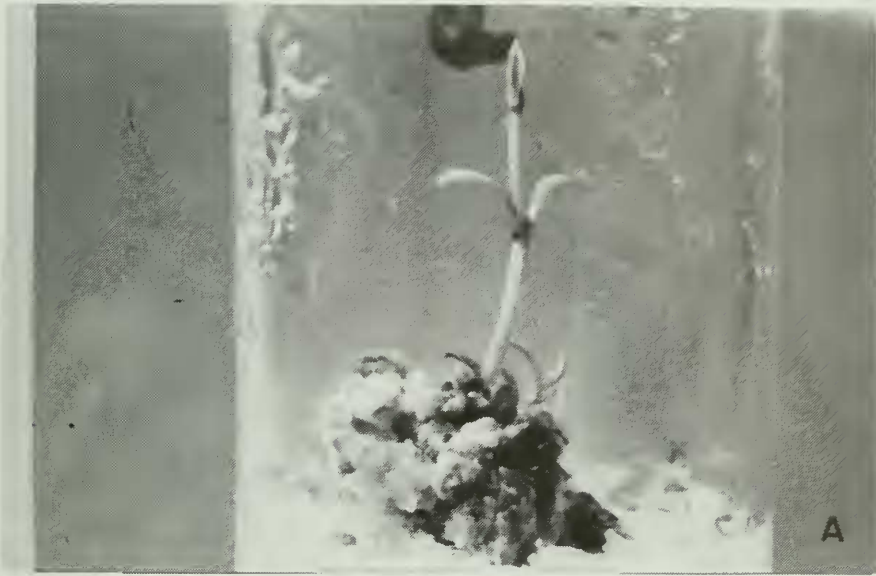


FIG. 1. A,B. A. Callo de hoja de *E. lactiflua*, de \pm 60 días, cultivada en medio Murashige y Skoog con BAP, ANA y GA_3 (0.5; 1.5 y 1.0 mg l⁻¹). B. Diferenciación de raíz desde callo de *E. lactiflua*, cultivado en las mismas condiciones que A.



FIG. 2. A,B. A. Formación de yemas desde callo foliar de *E. lactiflua*, de ± 120 días, en medio Murashige y Skoog con BAP, ANA y GA_3 (1.5; 0.5 y 1.0 $mg\ l^{-1}$). B. Inducción de raíces en plántula reorganizada de *E. lactiflua*, ± 120 días, en medio Murashige y Skoog con IBA, Sacarosa y CA (2 $mg\ l^{-1}$; 10 y 15 $g\ l^{-1}$).

ciones de 0.5; 1.5 y 1.0 mg l⁻¹ (1:3:2), se transformaron en callo con relativa rapidez considerando el tiempo de respuesta (+20 días). Estos callos se caracterizaron por su comportamiento organogénico (Krikorian, 1982), capaces de reorganizar plantas completas (Fig. 1 A). Esta condición se expresó al cultivarlos en un medio con los mismos reguladores de crecimiento a las concentraciones de 1.5; 0.5 y 1.0 mg l⁻¹ (3:1:2). Las formaciones semiesféricas de la superficie de los callos se diferenciaron en yemas en un tiempo de 30-40 días (Fig. 2 A).

La incubación de plántulas de *E. lactiflua*, derivadas de yemas, de 10-15 mm de longitud con 5-6 hojas en presencia de IBA más CA, originó la diferenciación de raíces adventicias después de 50-60 días (Fig. 2 B). Como las plántulas habían alcanzado 20-40 mm de largo, con 10-15 hojas al detectarse la presencia de raíces, esto podría indicar que esta mayor cantidad de hojas sintetizarían una cantidad suficiente de reguladores de crecimiento que interaccionarían con el regulador presente en el medio cultivo, provocando la diferenciación de raíces (Fosket, 1980). La detección de látex, secreción ausente en todos los estados anteriores; callos y plántulas de menor tamaño, estaría señalando que la actividad fotosintética asistida por el mayor número de hojas, aportaría una cantidad importante de hidratos de carbono para la síntesis de látex (Groeneveld *et al.*, 1983). Además, como el cierre de los frascos permite la entrada de CO₂, esto mantiene la fotosíntesis, como lo han demostrado de Proft *et al.*, (1985).

En cortes histológicos de plántulas menores de 20 mm de largo y con pocas hojas, se observan vasos laticíferos anastomosados totalmente vacíos de látex. Esta situación no difiere significativamente con investigaciones efectuadas en plantas en crecimiento de *Euphorbia latyris* (Groeneveld *et al.*, 1983), y en *Asclepias syriaca* (Wilson & Mahlberg, 1980).

La formación de raíces de callos de *E. lactiflua* en fase de multiplicación con BAP, ANA y GA₃ (1: 3: 2), Fig. 1 B, podría atribuirse a la presencia de "meristemoides" producidos por la acción de auxina (Torrey, 1966), la que induce la diferenciación de estos órganos. Debe indicarse que no se hizo análisis histológico para observar

la presencia de esos tejidos. Street (1977) señala que la formación de raíces se observa con frecuencia en cultivo de tejidos, aunque este comportamiento, aparentemente se detecta con mayor frecuencia en plantas cuyos tallos enraízan con las prácticas usuales de horticultura.

Los explantes foliares de *E. copiapina*, al tratarlos con BAP, ANA y GA₃ (1: 3: 2), formaron dos series de callos (+ 20 días), unos de color verde amarillento y otros amarillentos, respuesta que también se encuentra en otras plantas (Kackar & Shekhawat, 1989). Estos callos se multiplicaron sin dificultad al cambiarlos a medio fresco con igual concentración de reguladores. Al incubarlos en medio organogénico con BAP, ANA y GA₃ (3:1:2), no diferenciaron yemas como ocurrió en los callos de *E. lactiflua*.

La aplicación de Zeatina, 2iP, Kinetina, IBA y 2, 4-D a callos de *E. copiapina* no provocaron la diferenciación de yemas y en general, tienen un efecto negativo, abatiendo su proliferación y decolorándolos. Al incubarlos nuevamente con BAP, ANA y GA₃, se aprecia una recuperación total. Este comportamiento no tiene explicación por ahora, si se compara con el comportamiento de *E. lactiflua*. Esta especie respondió en la forma esperada a todos los tratamientos ensayados para establecer propágulos, proliferarlos, expresar organogénesis y formar raíces, según las fases establecidas por Murashige (1974).

Al comparar el crecimiento de callos cultivados en medio sólido contra los incubados en medio líquido en cajas Magenta con balsa de polipropileno, se observa evidente superioridad del medio líquido. La masa celular tiene un volumen 2-5 veces mayor presentando un aspecto sano y vigoroso (datos no mostrados). La ventaja del soporte de polipropileno propende a mejorar la aireación, mayor espacio para crecer, eliminación de metabolitos de efectos depresores sobre el callo, los que al desplazarlos hacia medio líquido, evitan un contacto prolongado con la masa en proliferación.

A la fecha (diciembre, 1992), se ha logrado diferenciar 410 plántulas de *E. lactiflua*, 190 están incubándose en medio para enraizar, 25 (13%) están enraizadas en maceteros y 5 plantas completas están aclimatadas en invernadero.